

Π. ΙΩΑΝΝΟΥ-ΑΜΑΡΑΝΤΙΔΟΥ

ΚΑΘΗΓ. ΧΗΜΕΙΑΣ

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

**ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΣΠΟΥΔΩΝ**

**"ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ"**

ΑΘΗΝΑ 2005

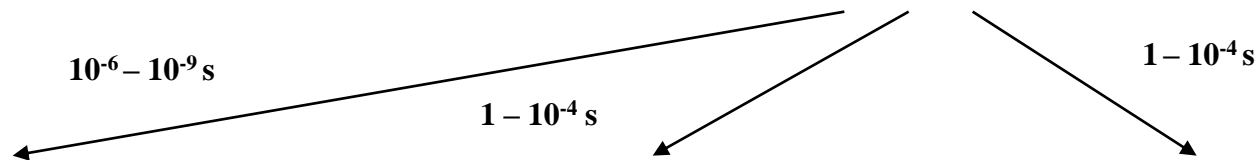
ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (LUMINESCENCE)

ΠΗΓΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ

- ✓ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΡΕΥΜΑ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ
- ✓ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΡΙΒΗΣ
- ✓ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΦΩΤΟΝΙΩΝ

ΕΙΔΟΣ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

- ΗΛΕΚΤΡΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (ELECTROLUMINESCENCE)
- ΡΑΔΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (RADIOLUMINESCENCE)
- ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (CHEMILUMINESCENCE)
- ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (BIOLUMINESCENCE)
- ΘΕΡΜΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (THERMOLUMINESCENCE)
- ΤΡΙΒΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (TRIBOLUMINESCENCE)
- ΦΩΤΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (PHOTOLUMINESCENCE)

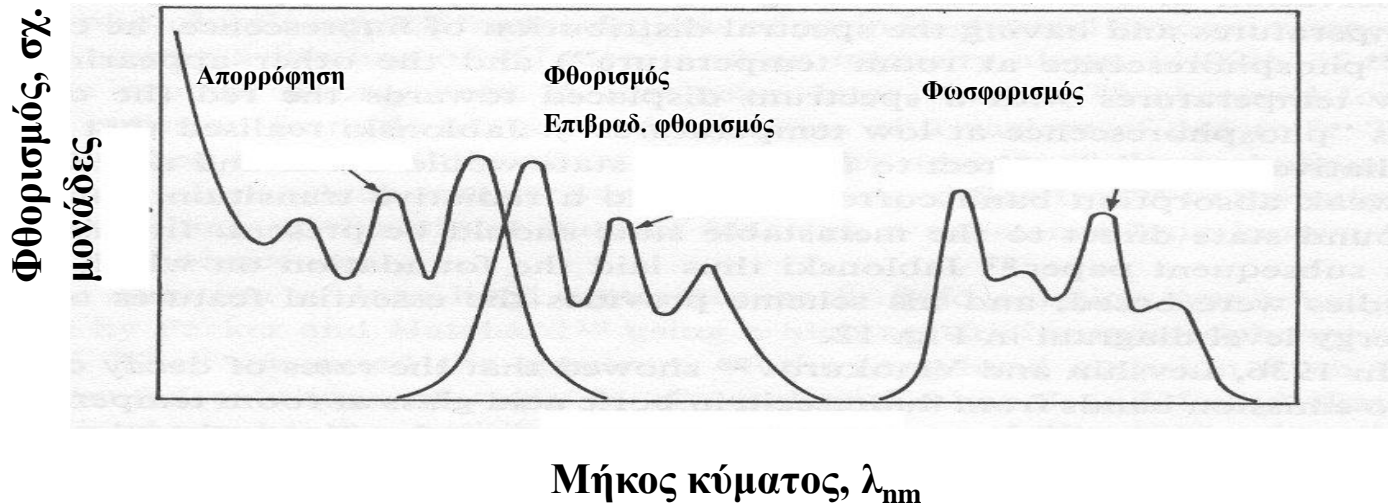
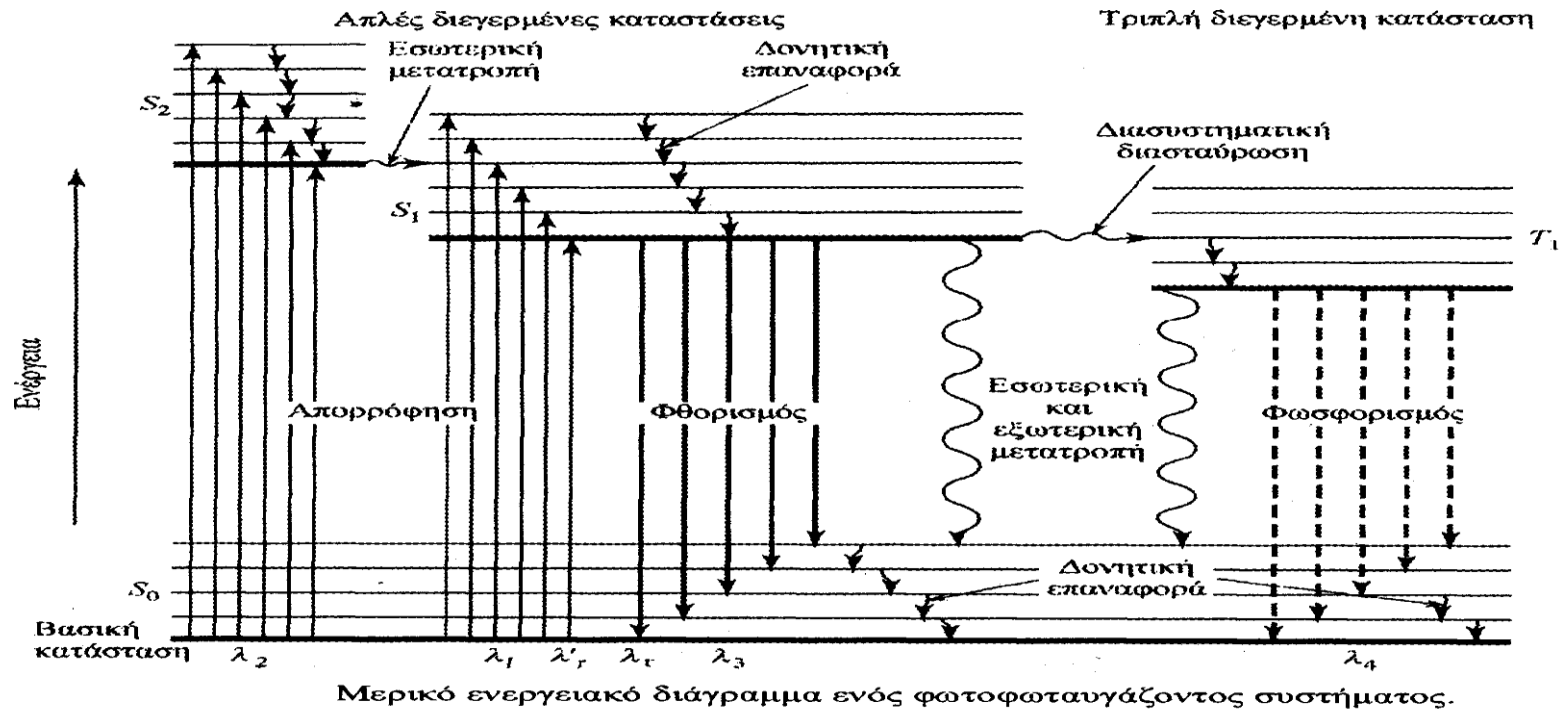


ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
(FLUORESCENCE)

ΦΩΣΦΟΡΙΣΜΟΣ
(PHOSPHORESCENCE)

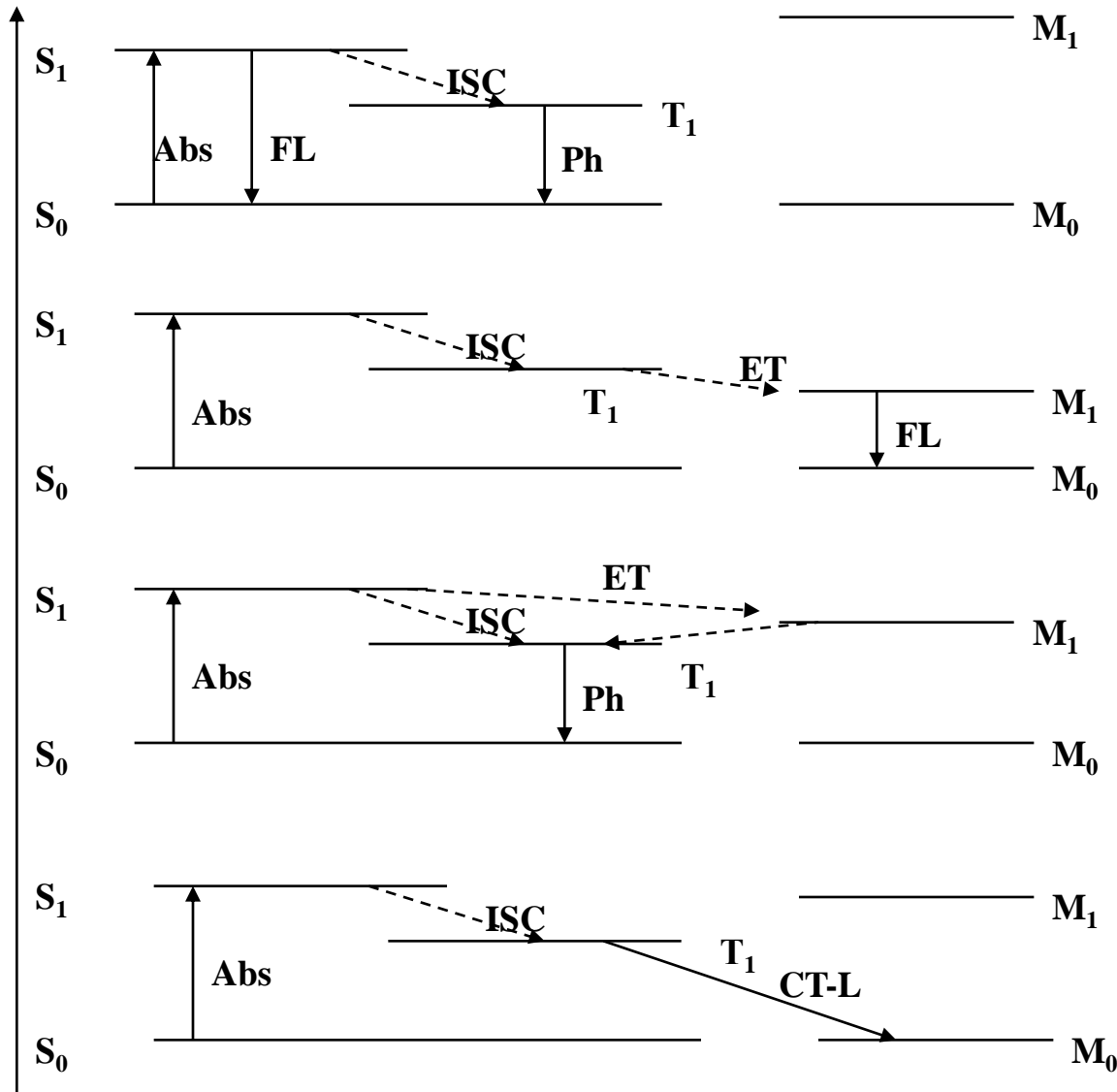
ΕΠΙΒΡΑΔ. ΦΘΟΡ
DELAYED FLUOR.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΦΩΤΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

ΕΝΕΡΓΕΙΑ



Μεταφορά Ενέργειας

Λανθανίδες (Tb, Sm, Dy, Eu)

Στοιχεία Μετάπτωσης

(Pd και Pt με πορφυρίνες)

Μεταφορά Φορτίου

Ru, Os, Ir + N-ετεροκυκλικοί υποκαταστάτες

(συλλέκτες ηλιακής ενέργειας)

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ

✓ ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ

✓ pH

✓ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

✓ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

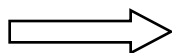
✓ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ

ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΗ

✓ Υπαρξη π - ηλεκτρονιακού συστήματος ($\lambda_{ex} > 220\text{nm}$)

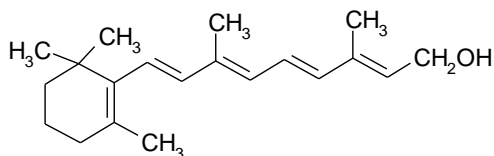
✓ Εκτεταμένο π - ηλεκτρονιακό σύστημα συνεπάγεται

Φθορισμός



Μεγάλα μήκη κύματος

Φωσφορισμός



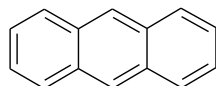
Vitamin A₁

$\lambda_{ex} = 333\text{nm}$, $\lambda_{em} = 500\text{nm}$



Βενζόλιο

S₁ 263 nm, T₁ 340 nm



Ανθρακένιο

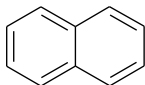
S₁ 376 nm, T₁ 680 nm

✓ Χαμηλότερη διεγερμένη απλή κατάσταση

$\pi^* - \pi$ \longrightarrow Ισχυρός φθορισμός (φωσφ.)

$\pi^* - n$ \longrightarrow Ασθενής φθορισμός, ισχυρός
φωσφορισμός σε περιβ. μεγάλου
ιξώδους

Ναφθαλίνο

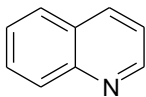


$\pi^* - \pi$

Φθορισμός

Φωσφορισμός

Κινολίνη

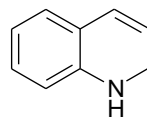


$\pi^* - n$

Δε φθορίζει

(μη πολικ. διαλ)

Ινδόλιο



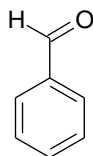
$\pi^* - \pi$

Φθορισμός

Φωσφορισμός

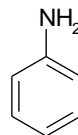
✓ *o* - *p* - υποκαταστάτες \longrightarrow αύξηση φθορισμού

✓ *m* - υποκαταστάτες \longrightarrow ελάττωση φθορισμού



-NO₂
-COOH
-CH₂COOH
+Cl, -Br, -I
-O-
-NH₃⁺

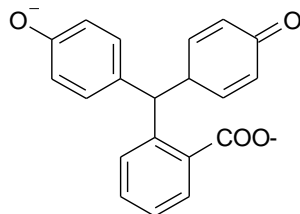
Δε φθορίζει



-OH
-O-CH₃
-NH₂
-NHCH₃
-F

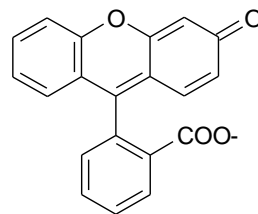
Φθορίζει

✓ Αύξηση μοριακής ακαμψίας \longrightarrow αύξηση φθορισμού



ΦΑΙΝΟΛΟΦΘΑΛΕΪΝΗ

(ΔΕ ΦΘΟΡΙΖΕΙ)



ΦΛΟΥΟΡΕΣΚΕΪΝΗ

(ΦΘΟΡΙΖΕΙ)

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ

✓ **ΥΨΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (zero background technique)**

✓ **ΜΕΓΑΛΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (multiparameter technique)**

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ:

λ_{ex} , λ_{em} , τ , $\lambda_{phosph.}$, P , μη ειδικές παράμετροι

✓ **ΑΠΛΗ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΑ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

✓ Συντελεστής
κβαντικής απόδοσης

$$\Phi_F = \frac{\text{Αρ. εκπεμπ. φωτονίων}}{\text{Αρ. αποροφ. φωτονίων}} = \frac{k_f}{k_f + \sum k_{\text{non-f}}}$$
$$0 < \Phi_F < 1$$

✓ Ισχύς απορροφούμενης
ακτινοβολίας

$$P_A = P_0 - P_t = P_0 (1 - e^{-2.303 \epsilon bc})$$

✓ Ισχύς εκπεμπόμενης
ακτινοβολίας

$$F = \Phi_F P_A = \Phi_F P_0 (1 - e^{-2.303 \epsilon bc})$$

$$(2,303 \epsilon bc - (2,303 \epsilon bc)^2/2! + (2,303 \epsilon bc)^3/3!)$$

✓ Σε πολύ αραιά διαλύματα ($\epsilon bc < 0.05$)

$$F = 2.303 \Phi_F P_0 \epsilon bc = K c$$

✓ Χρόνος ζωής φθορισμού

$$\tau_F = \Phi_F \tau_n$$

✓ Ισχύς φθορισμού σε χρόνο t μετά
τη διέγερση

$$F_t = F_0 e^{-t/\tau}$$

✓ Πόλωση φθορισμού

$$P = (F_H - F_V) / (F_H + F_V)$$

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

- Φθορισμόμετρα
- Φασματοφθορισμόμετρα
- Φθορισμόμετρα για ειδικές εφαρμογές



ΣΧΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΜΑΤΟΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΟΥ

ΠΗΓΕΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ

-Λυχνίες τόξου υδραργύρου [υψηλής (366nm) και χαμηλής πίεσης (254nm)]

-Λυχνίες τόξου αερίου ξένου (συνεχές φάσμα, 250-600nm)

α) συνεχούς εκπομπής

β) στιγμιαίας εκπομπής

-Λείζερ (ενισχυτές φωτός εξαναγκασμένης εκπομπής)

α) μονοχρωματικοί

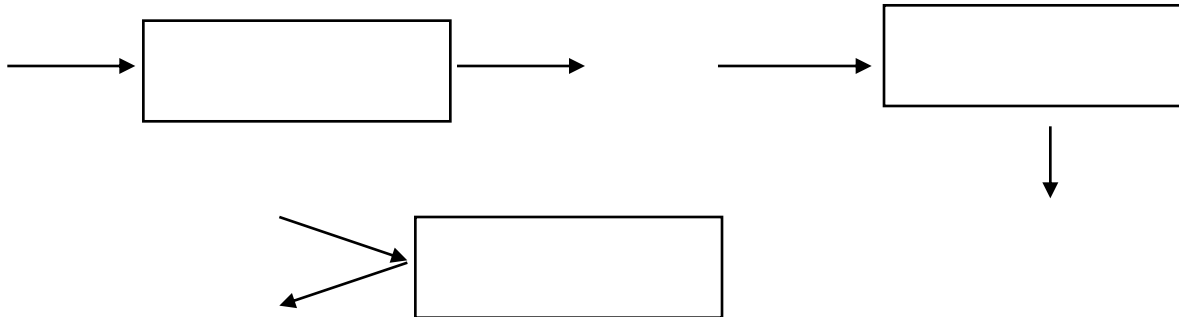
β) λέιζερ χρωστικών με επιλογή μήκους κύματος

ΕΠΙΛΟΓΕΙΣ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ

-Φίλτρα (υάλου αποκοπής ή συμβολής)

-Μονοχρωμάτορες (πρίσματος, φράγματος)

ΚΥΨΕΛΙΔΕΣ



ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

-Φωτοπολλαπλασιαστές (PMT)

-Ανιχνευτές ζεύξης φορτίου (Charge-coupled detectors)

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

✓ ΣΚΕΔΑΣΗ (SCATTERING)

⇒ *Rayleigh* (μόρια διαλύτη, $\ll \lambda$)

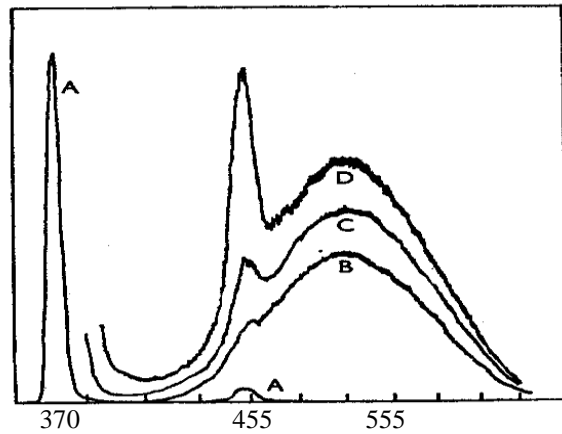
⇒ *Tyndall* (μικρά σωματίδια, $< \lambda$)

⇒ *Raman* (δονητικές και περιστροφικές κινήσεις μορίων διαλύτη)

✓ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

✓ ΑΠΟΣΒΕΣΗ (QUENCHING)

✓ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΦΙΛΤΡΟΥ (INNER FILTER EFFECT)

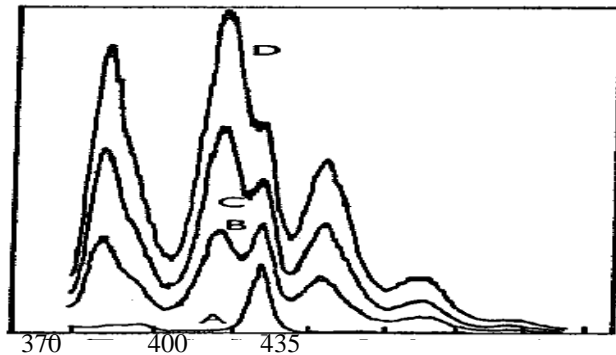


Φάσμα εκπομπής θεικής κινίνης ($\lambda_{ex}=366nm$) και παρεμπόδιση από σκέδαση Raman

A- H₂O; B- 0,1μg/ml κινίνης (σε ίδια ευαισθησία)

C, D- 0,1 μg/ml κινίνης (υψηλή ευαισθησία)

λ, nm

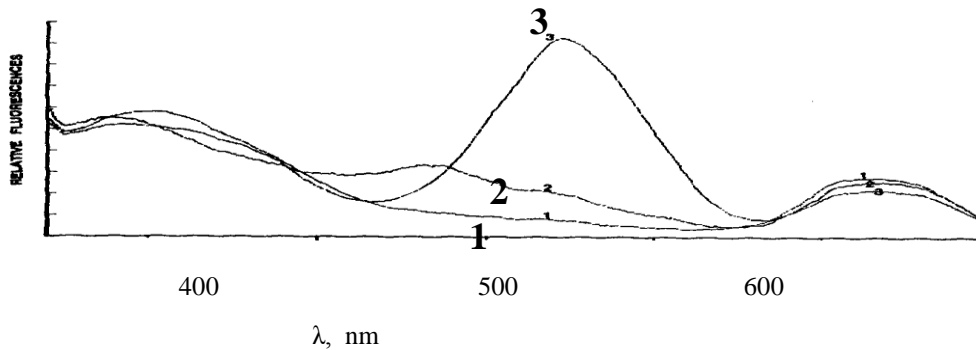


Φάσμα εκπομπής ανθρακένιου σε κυκλοεξάνιο και παρεμπόδιση από σκέδαση Raman

A- διαλύτης

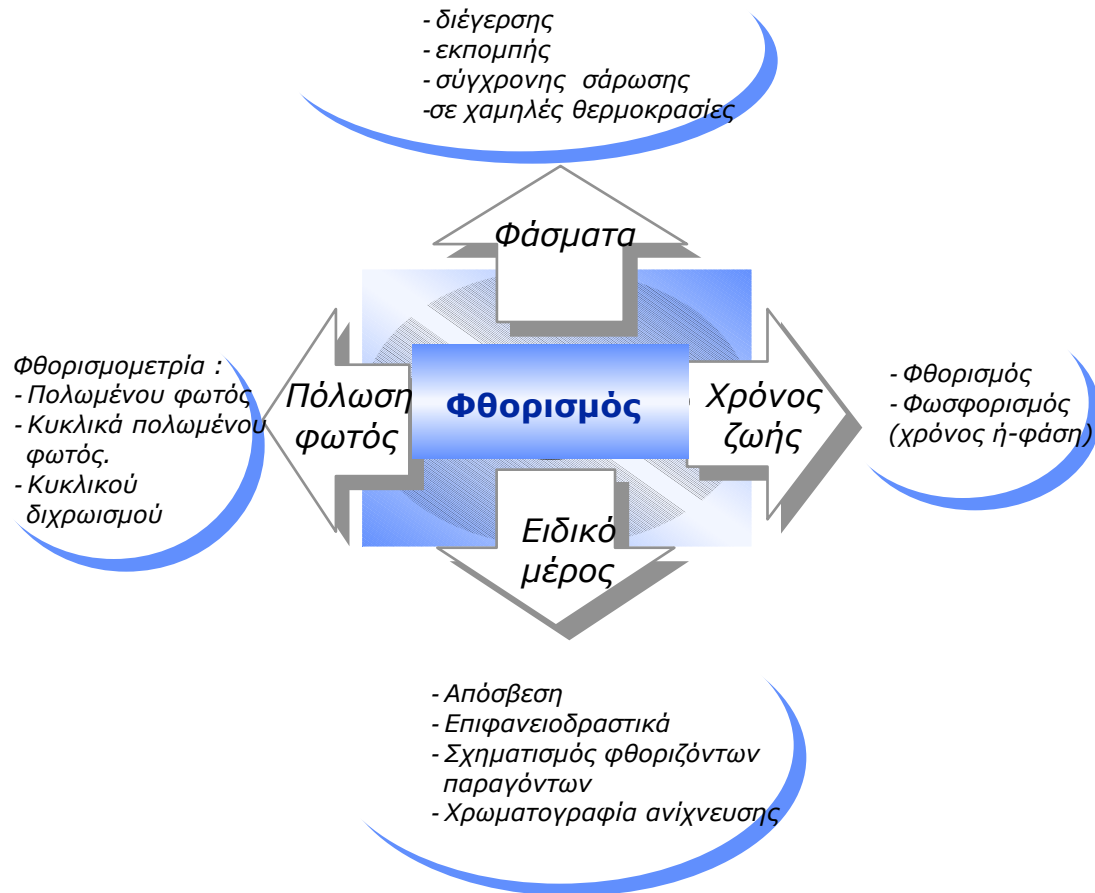
B, C, D- ανθρακένιο σε διάφορες συγκεντρώσεις

λ, nm

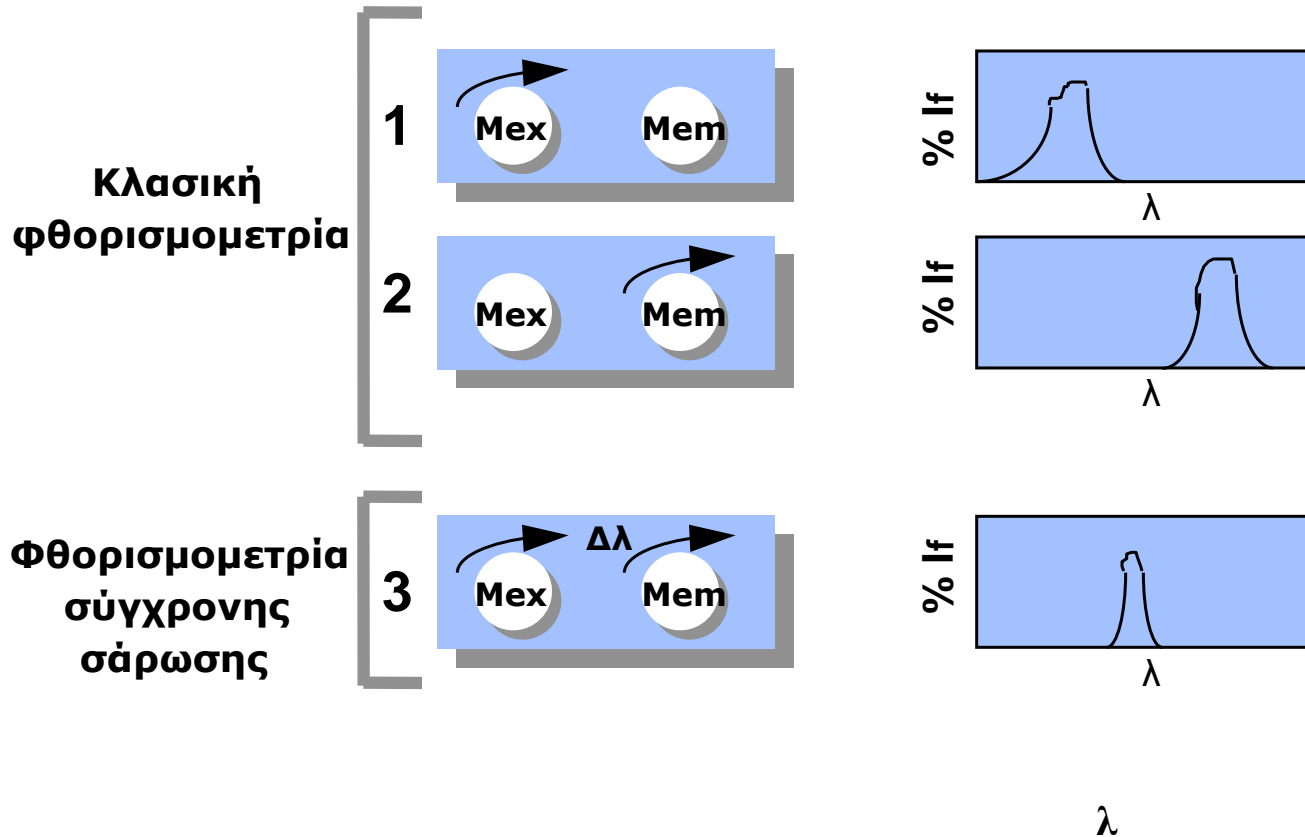


1. Φυσιολογικός ορός
2. Αιμολυμένος ορός
3. Υκτερικός ορός

ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΟΤΗΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ



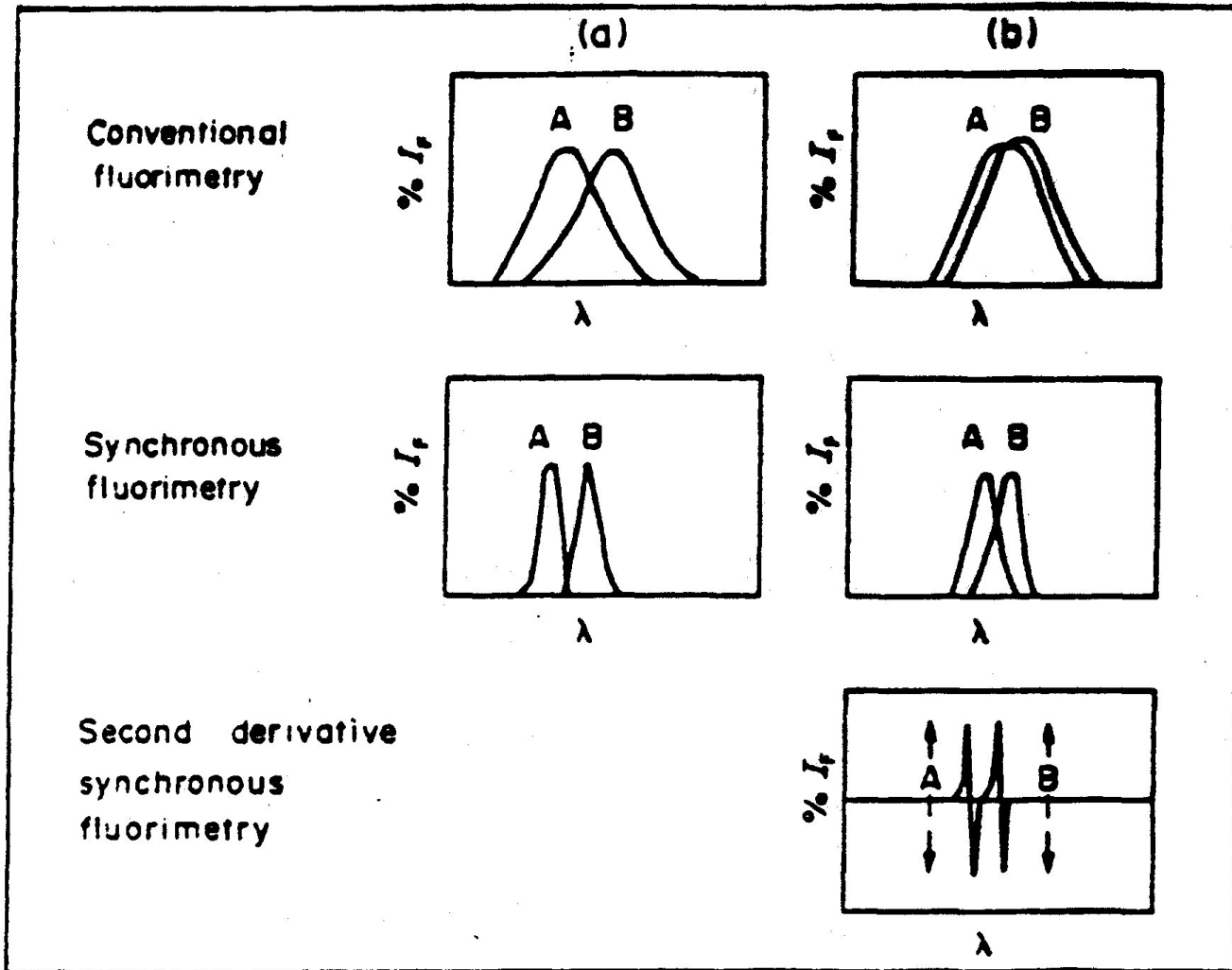
ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ($\Delta\lambda = \text{const}$)



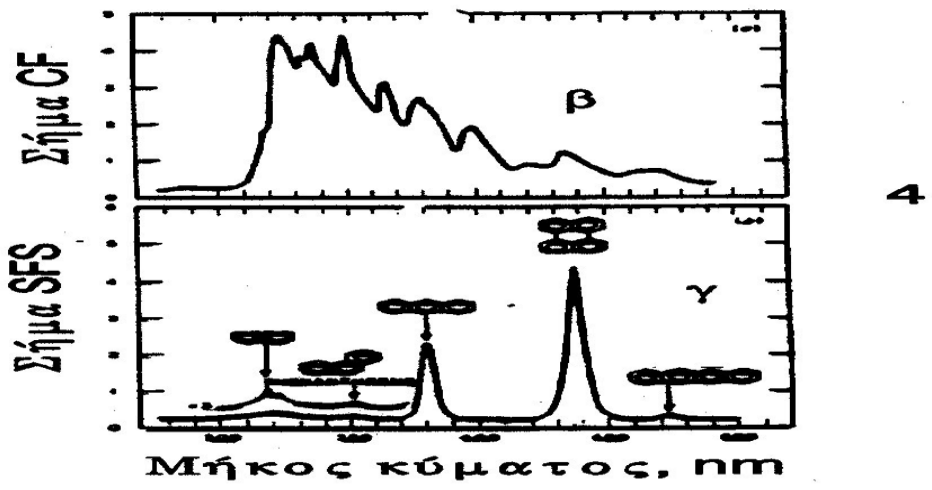
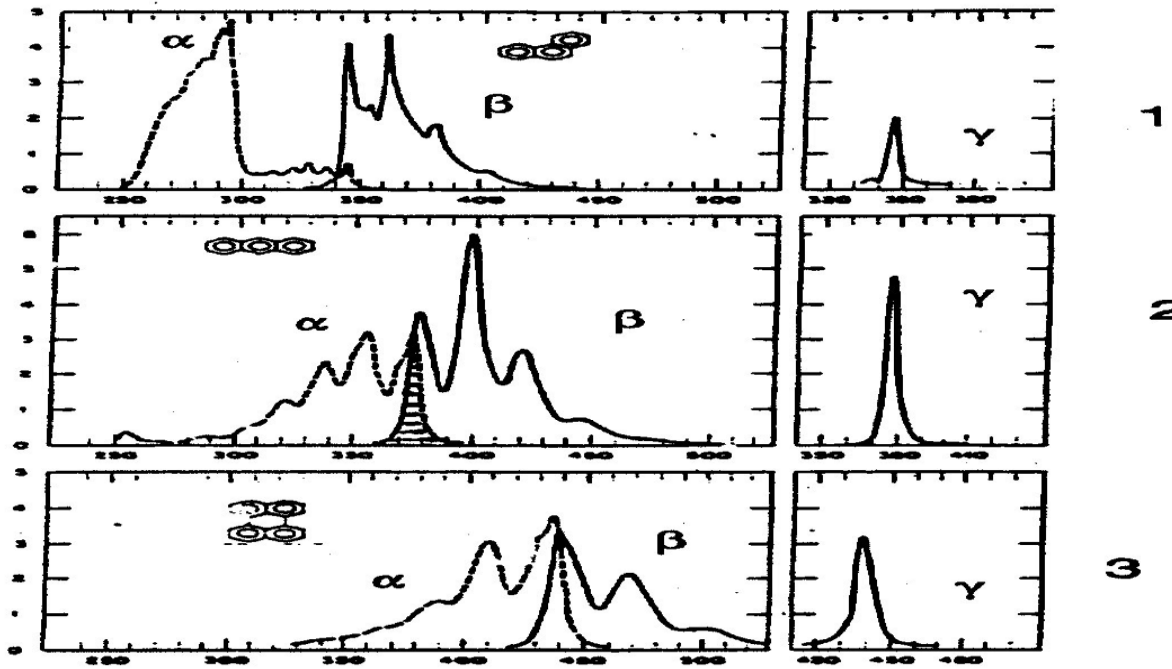
Βασικά χαρακτηριστικά φάσματος:

- Ελάττωση ημιεύρους κορυφής
- Απλοποίηση φάσματος
- Ελάττωση φασματικής περιοχής αναλυτικού ενδιαφέροντος

Synchronous fluorescence spectroscopy



Αναλυτικό σήμα

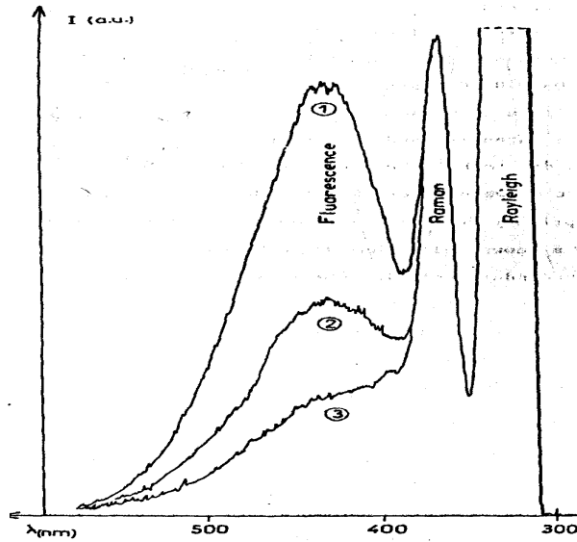


Φάσματα διέγερσης (excitation), α, εκπομπής (emission), β, κλασικής φθορισμομετρίας, CF, και σύγχρονης σάρωσης (SFS), γ, του φαιναθρενίου, 1, ανθρακενίου, 2, πυρυλενίου, 3, και μίγματος αυτών με τετρακένιο. Είναι φανερός ο διαχωρισμός των κορυφών που επιτυγχάνεται και η καλύτερη ευκρίνεια.

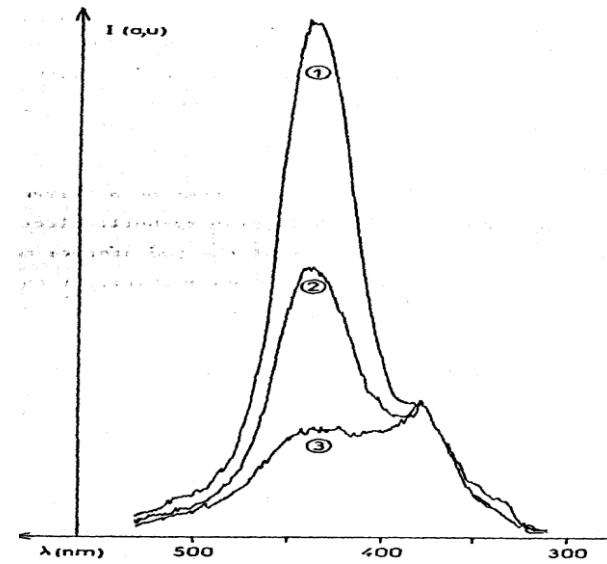
**ΦΑΣΜΑΤΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ
ΔΙΑΙΘΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΤΟΥ
ΛΥΣΕΡΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (LSD), $\lambda_{ex}=325$
nm**

**ΦΑΣΜΑΤΑ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ
ΣΑΡΩΣΗΣ, $\Delta\lambda = 110$ nm**

1) 1 ng/ml 2) 0.3 ng/ml 3) H₂O

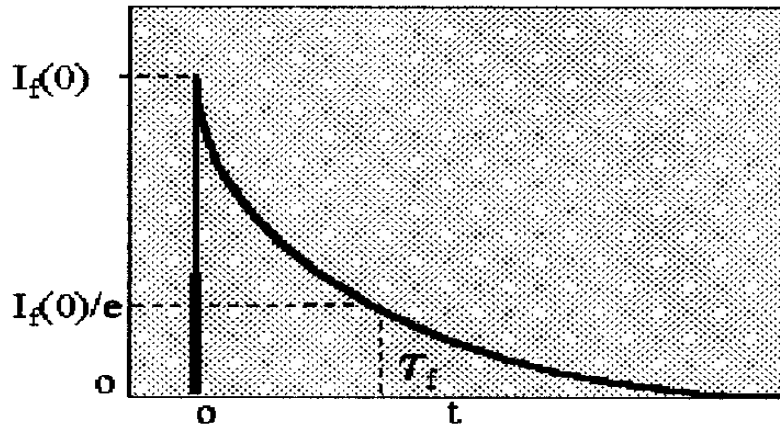


DOL= 0.1 ng/ml



DOL= 2 ng/l

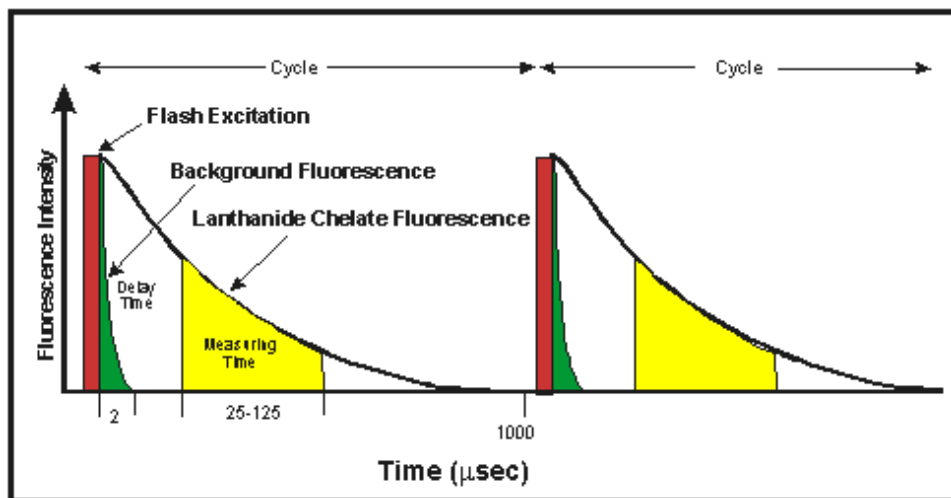
ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



FLUORESCENCE
DECAY CURVE

Inherent property of a fluorophore ($\tau \sim 1/\varepsilon$)
Sensitive to microenvironment

ΑΡΧΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΧΩΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Time-resolved Fluorimetry)



- ✓ Χρήση ιχνηθετών μεγάλου χρόνου ζωής φθορισμού (ιόντα λανθανίδων)
- ✓ Διέγερση δείγματος με βραχύ παλμό ακτινοβολίας
- ✓ Μέτρηση μετά απόσβεση βραχύβιου φθορισμού υποβάθρου

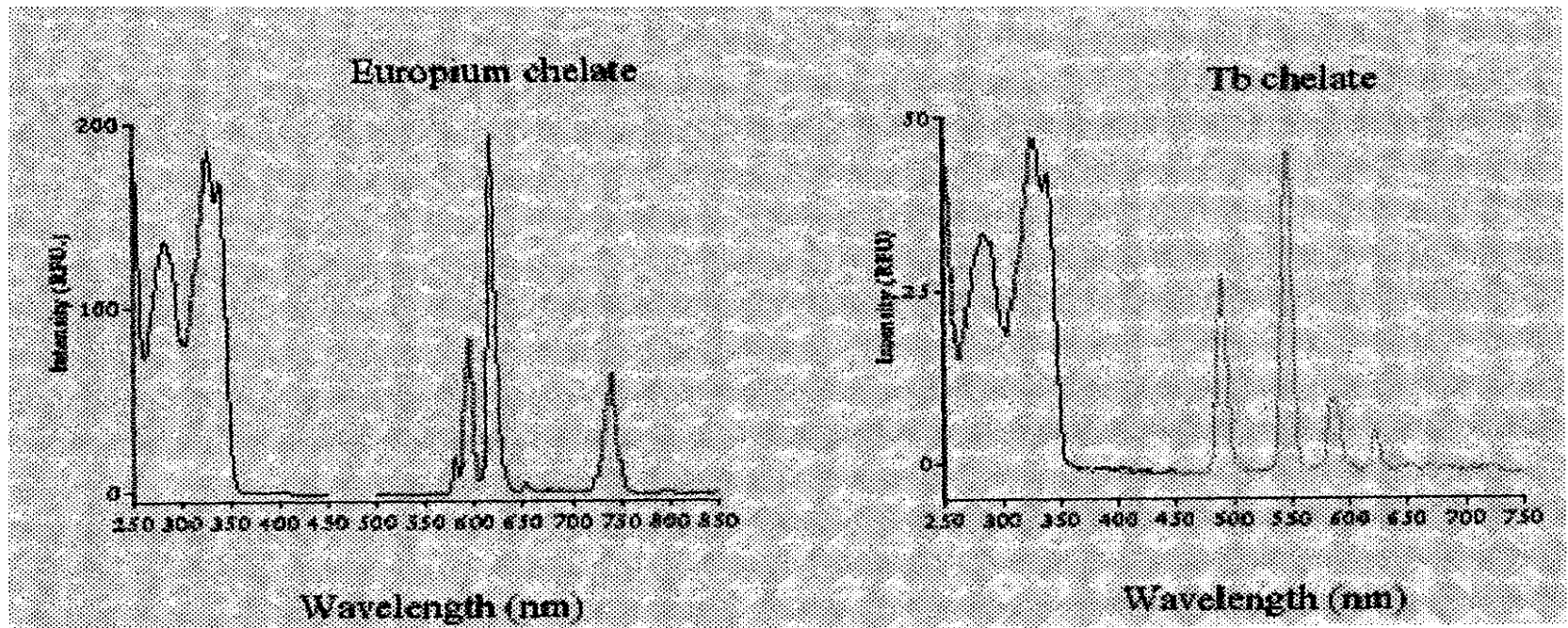
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ:

- Ελάττωση ακτινοβολίας υποβάθρου
- Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί
- Μέθοδοι υβριδοποίησης DNA

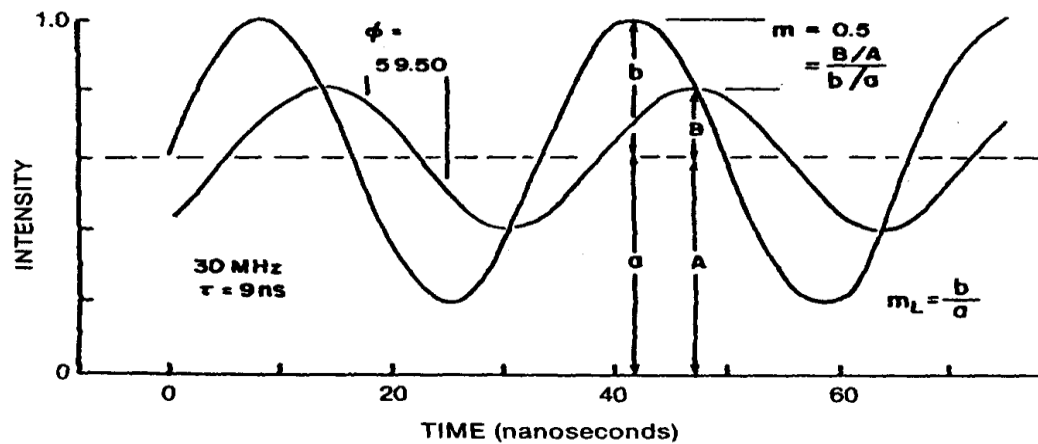
Απόσβεση φθορισμού συμπλόκων ενώσεων λανθανιδών

Chelate	Excitation(nm)	Emission (nm)	Fluorescence Lifetime (τ) (μ sec)	Suggested Emission Filter
Europium (Eu)	340	615	730	620/40
Samarium (Sm)	340	642	50	645/40
Terbium (Tb)	320	545	1050	545/40
*Dyprosium (Dy)	320	572	16	575/15
*Ruthenium (Ru)	459	620	0.4	620/40

ΙΟΝΤΙΚΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΥΡΩΠΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΡΒΙΟΥ



ΑΡΧΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΦΑΣΙΚΑ ΔΙΑΧΩΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (Phase-resolved Fluorimetry)

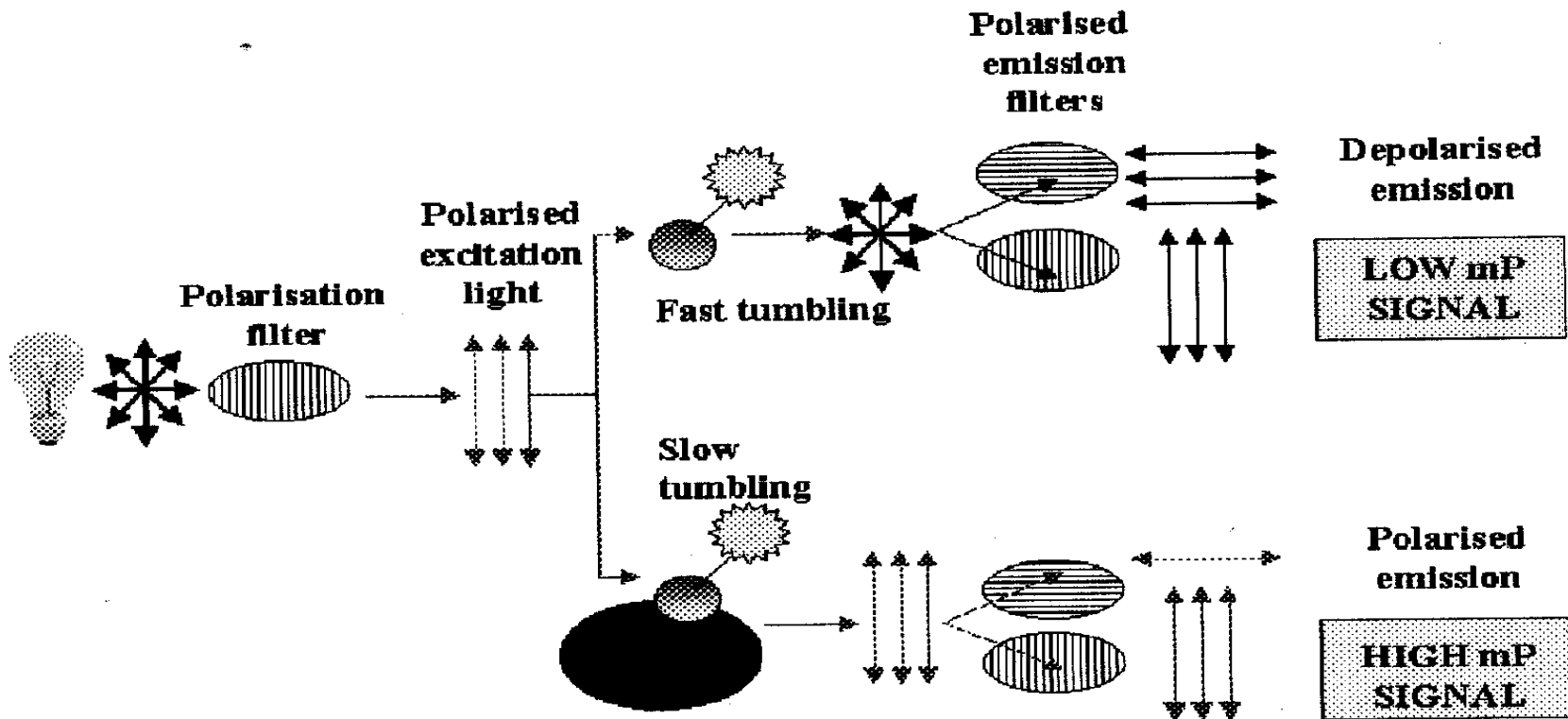


ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ:

- Προσδιορισμός χρόνου ζωής φθορισμοφόρων
- Ανάλυση μίγματος ουσιών

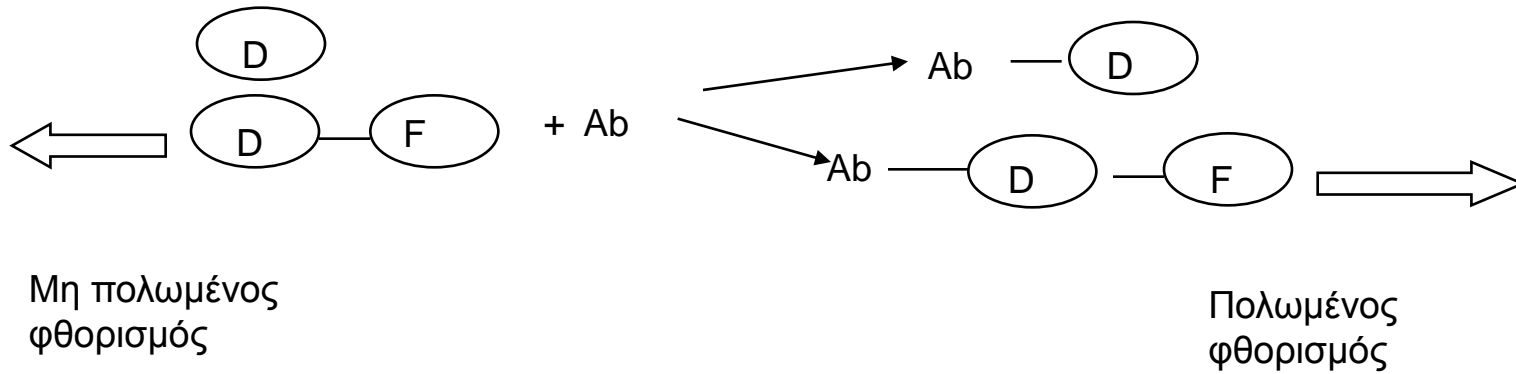
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ ΠΟΛΩΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

(FLUORESCENCE POLARIZATION)

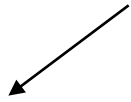


ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Προσδιορισμός μεγέθους και ολικών διαστάσεων μακρομορίων επισημασμένων με φθορισμοφόρα
- Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί συναγωνιστικού τύπου



ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ



ΑΜΕΣΕΣ

(Ενδογενής φθορισμός)

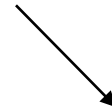
-ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

-ΦΑΡΜΑΚΑ

-ΑΜΙΝΟΞΕΑ

-ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ

-ΠΟΛΥΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ



ΕΜΜΕΣΕΣ

(Μετατροπή σε φθορίζον προϊόν)

α) Σχηματισμός φθορίζοντος παραγώγου με σύνδεση με φθορίζουσες ουσίες (δανσυλοχλωρίδιο για αμινοξέα και φαινόλες, ο-φθαλαλδεΰδη για πρωτοταγείς αρυλαμίνες, αρυλυδραζίνες)

β) Μετατροπή του αναλύτη σε φθορίζον προϊόν μέσω χημικών αντιδράσεων

γ) Σχηματισμός φθορίζοντος συμπλόκου για τον προσδιορισμό μεταλλοϊόντων ή οργανικών μορίων

δ) Με απόσβεση ή ενίσχυση φθορισμού

**T A B L E 4-1. EXAMPLES OF ANALYTES
MEASURED BY FLUORESCENCE**

Analytes	Therapeutic Drugs
Bile acids	Amikacin
Bilirubin	Carbamazepine
Calcium	Digoxin
Catecholamines	Gentamicin
Estrogens (urinary)	Lidocaine
Glucose	Phenobarbital
Magnesium	Phenytoin
Nucleotides	Primidone
Protoporphyrin	Procainamide
Coagulation	Quinidine
Antithrombin III	Theophylline
Heparin	Tobramycin
Plasminogen	Hormones
Enzymes	Cortisol
CK-MB	FSH
Glucosidases	hCG
Hydrolases	LH
Oxidoreductases	Thyroid uptake
Proteases	Thyroxine
	TSH
	Other
	Ferritin
	IgE

Abbreviations: CK-MB: creatinine kinase isoenzyme-muscle brain dimer; FSH: follicle-stimulating hormone; hCG: human chorionic gonadotropin; LH: luteinizing hormone; TSH: thyroid-stimulating hormone; IgE: gamma E immunoglobulin.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΜΜΕΣΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- ✓ Μέθοδοι διαχωρισμού με ανιχνευτή φθορισμού
(Χρωματογραφικές τεχνικές, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση)
- ✓ Μέθοδοι ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- ✓ Ενζυμική ανάλυση
 - α) Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων
 - β) Προσδιορισμός υποστρωμάτων
- ✓ Προσδιορισμός μεγέθους και ολικών διαστάσεων μακρομορίων επισημασμένων με φθορισμοφόρα
(Φθορισμομετρία πολωμένου φθορισμού)
- ✓ Μελέτη σύνδεσης μικρομορίων, π.χ. φαρμάκων με πρωτεΐνες
(Τεχνική φθορίζοντος ιχνηθέτη)
- ✓ Μετρήσεις αποστάσεων μεταξύ ομάδων μακρομορίου με βάση το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας
- ✓ Μικροσκοπία φθορισμού
(Χρώση κυττάρων, χρήση επισημασμένων αντισωμάτων ειδικών για τα συστατικά του κυττάρου)
- ✓ Φθορισμοανοδοχημικοί προσδιορισμοί
- ✓ Μέθοδοι υβριδοποίησης DNA

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a distance-dependent interaction between the electronic excited states of two dye molecules in which excitation is transferred from a donor molecule to an acceptor molecule *without emission of a photon*. The efficiency of FRET is dependent on the inverse sixth power of the intermolecular separation, ~~making it useful over~~ making it useful over distances comparable with the dimensions of biological macromolecules. Thus, FRET is an important technique for investigating a variety of biological phenomena that produce changes in molecular proximity. ~~When FRET is used as a contrast mechanism, colocalization of proteins and other molecules can be imaged with spatial resolution beyond the limits of conventional optical microscopy.~~

Primary Conditions for FRET

- Donor and acceptor molecules must be in close proximity (typically 10–100 Å).
- The absorption spectrum of the acceptor must overlap the fluorescence emission spectrum of the donor (see figure).
- Donor and acceptor transition dipole orientations must be approximately parallel.

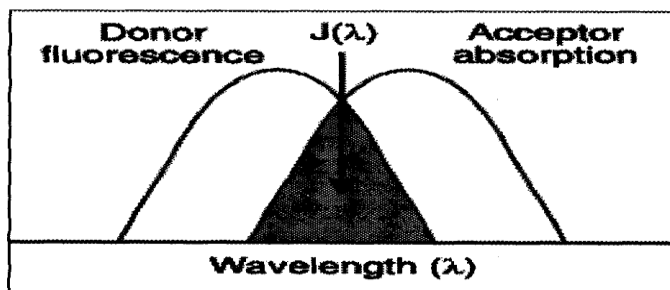
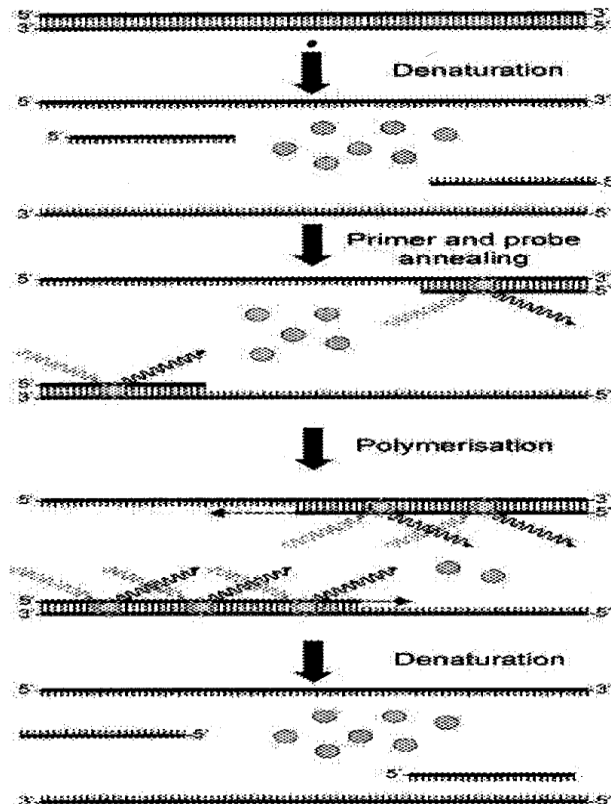


Figure. Schematic representation of the FRET spectral overlap integral.

Förster Radius

The distance at which energy transfer is 50% efficient (i.e., 50% of excited donors are deactivated by FRET) is defined by the Förster radius (R_0). The magnitude of R_0 is dependent on the spectral properties of the donor and acceptor dyes:

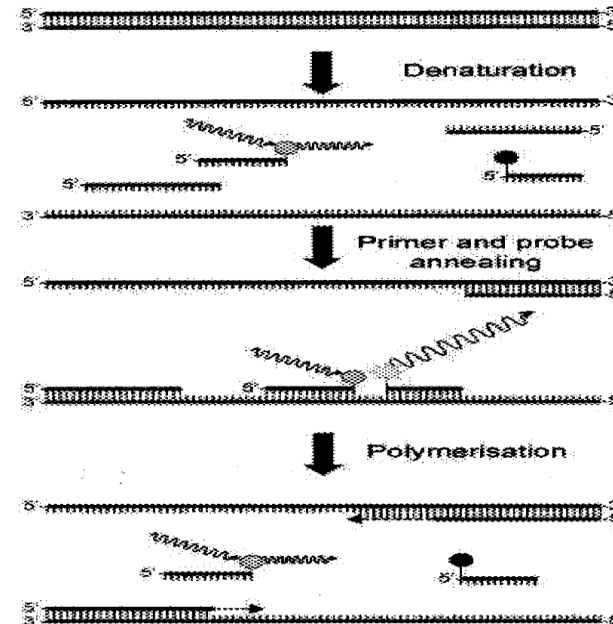


A

B

C

D



A

B

C

FIGURE 4. The Lightcycler assay. *Left*: Dye incorporation method. (A) During denaturation, unbound SYBR Green I dye exhibits little fluorescence. (B) At the annealing temperature, a few dye molecules bind to the double-stranded primer/target, resulting in light emission upon excitation. (C) During the polymerisation step, more and more dye molecules bind to the newly synthesised DNA, and the increase in fluorescence can be monitored in real-time. (D) On denaturation, the dye molecules are released and the fluorescence signal returns to background. *Right*: Hybridisation probe method. The RT step has been omitted. (A) During the denaturation step, both hybridisation probes remain in solution and separate. Any emission from fluorescein is at 530 nm, and is disregarded by the detector. (B) During the annealing step, the probes hybridise in a head-to-tail arrangement, the two dyes come in close proximity and the emitted energy excites the second dye, which emits red fluorescent light at a longer wavelength. (C) At the polymerisation temperature, both probes return into solution and any emissions from fluorescein are ignored.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Parker CA, Photoluminescence of Solutions, Elsevier, Amsterdam, 1968
2. Hemmila IK, Applications of Fluorescence in Immunoassays, John Wiley & Sons, New York, 1991
3. Rubio S, Gomez-Henz A, Valcarcel M, “Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy”, Talanta, 33, 633-640, 1986
4. Seitz RW, “Fluorescence derivatization”, CRC (Critical Reviews in Analytical Chemistry), p. 367, 1980
5. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Principles of Instrumental Analysis, Brooks/Cole Pub Co; 5th edition, 1997
6. Tietz Textbook of Clinical Chemistry- 2nd ed., edited by CA Burtis, ER Ashwood, Saunders Company, 1994, ch. 4, p. 132-159
7. Bright FV, “Bioanalytical Applications of Fluorescence Spectroscopy”, Anal Chem, 60, 1031A, 1988
8. Gudgin Dickson EF, Pollak A, Diamandis EP, “Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays”, J Photochem Photobiol, B: Biology, 27, 3-19, 1995